增效醚对二化螟幼虫7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶和羧酸酯酶活性的影响

李 阳, 史雪岩*, 高希武*

(中国农业大学植物保护学院昆虫系, 北京 100193)

摘要:【目的】通过研究二化螟 *Chilo suppressalis* 细胞色素 P450 酶活性特征及增效醚(piperonyl butoxide,PBO)对二化螟幼虫7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(ECOD)和羧酸酯酶(CarE)活性影响的时间效应,为有效进行二化螟的防治及抗药性治理提供基础的研究数据。【方法】采用以7-乙氧基香豆素为底物的荧光比色法,测定了不同龄期二化螟 ECOD 活性,并研究了经 PBO(0.69 μg/头)点滴处理后24 h 内每隔1 h 二化螟4龄幼虫 ECOD 及 CarE 活性的变化。【结果】二化螟的 ECOD 活性从1龄幼虫至蛹期呈现出先升高后降低的变化趋势,其中 ECOD 活性在4龄幼虫期升至最高值14.11 ±1.01 pmol/mg pro · min,而在蛹期降到最低值(1.34 ±0.11 pmol/mg pro · min)。PBO 处理对二化螟4龄幼虫 ECOD 活性的影响具有随时间而变化的抑制-诱导-抑制的动态效应:在处理后4 –9 h,PBO 对 ECOD 活性具有抑制作用,其中在处理后6 h 时的抑制作用最强,抑制率达到21%;在处理后10 –11 h,PBO 诱导了 ECOD 活性升高;在处理后15 –17 h,又表现为抑制作用。PBO 处理二化螟后10 –12 h 和18 –20 h 对二化螟的 CarE 活性具有诱导作用,而在14 –17 h 和20 –21 h 表现为抑制作用。【结论】不同龄期二化螟幼虫及蛹的 ECOD 活性存在一定差异。PBO 点滴处理对二化螟4龄幼虫的 ECOD 和 CarE 活性具有时间依赖的抑制或诱导效应。

关键词: 二化螟; 增效醚; 细胞色素 P450 酶; 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶; 羧酸酯酶

中图分类号: Q965.9 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2016)11-1159-07

In vivo effects of piperonyl butoxide on the activities of 7-ethoxycoumarin O-deethylase and carboxylesterase in larval *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

LI Yang, SHI Xue-Yan*, GAO Xi-Wu* (Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】In order to provide data for efficient management of insecticide resistance of *Chilo suppressalis* (Walker), we measured the cytochrome P450-mediated 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) activity in different instars of larval *C. suppressalis*, and evaluated the time-dependent *in vivo* effects of piperonyl butoxide (PBO) treatment on the activities of ECOD and carboxylesterase (CarE) in the 4th instar larvae.【Methods】By using 7-ethoxycoumarin as the substrate, the ECOD activity in different instar larvae and pupae of *C. suppressalis* was determined by fluorospectrophotometric analysis. Variations of ECOD and CarE activities in the 4th instar larvae were examined at each hour within 24 hours after treatment topically by PBO (0.69 μg/larva).【Results】The ECOD activity in *C. suppressalis* from the 1st instar larval stage to the pupal stage showed a firstly increasing and then decreasing trend. The ECOD activity increased to the highest level of 14.11 ±1.01 pmol/mg pro · min in the 4th instar larvae,

基金项目: 公益性行业(农业)科技专项(201203038)

作者简介: 李阳, 1986年7月生, 河南平顶山人, 硕士, 助理工程师, 研究方向为农药与昆虫毒理学, E-mail: liyangcau2008@sina.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: shixueyan@cau.edu.cn; gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期 Received: 2016-08-04; 接受日期 Accepted: 2016-09-16

while decreased to the lowest (1.34 ± 0.11 pmol/mg pro · min) in pupae. PBO exhibited time-dependent effects on the ECOD activity of the 4th instar larvae. As compared with the untreated control, PBO treatment inhibited the ECOD activity during 4 – 9 h with a maximal inhibition rate of 21% at 6 h, induced its activity during 10 – 11 h, and then inhibited its activity during 15 – 17 h. In addition, PBO exposure also affected the CarE activity in the 4th instar larvae, showing inhibition effects during 14 – 17 h and 20 – 21 h and induction effects during 10 – 12 h and 18 – 20 h after treatment. 【Conclusion】 The ECOD activity varies in different instar larvae and pupae of *C. suppressalis*. PBO treatment displays time-dependent effects of inhibition or induction on the activities of ECOD and CarE in the 4th instar larvae of *C. suppressalis*.

Key words: *Chilo supperssalis*; piperonyl butoxide; cytochrome P450; 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD); carboxylesterase

二化螟 *Chilo supperssalis* (Walker) 属鳞翅目螟蛾科昆虫,以幼虫危害水稻,是水稻生产中的主要害虫之一,广泛分布于我国南北各稻区(鲁艳辉等, 2016)。近年来,耕作制度的变革、杂交稻的大面积种植、气候变化等原因均导致了二化螟种群数量增大,给水稻生产造成了严重损失,严重阻碍了水稻的稳产和高产(辛文和张志涛, 2001; 鲁艳辉等, 2016)。现阶段,使用化学杀虫剂仍是防治二化螟的主要手段。许多研究报道,二化螟对常用药剂已产生了不同程度的抗性(池仕运等, 2005; He *et al.*, 2008; 常菊花和何月平, 2016)。

细胞色素 P450 酶系(cytochrome P450s, P450s)是昆虫体内一种重要的解毒酶系,在昆虫代谢杀虫剂等物质的过程中发挥着重要作用,有研究表明其活性的增强是大多数害虫对杀虫剂产生高水平抗性和交互抗性的主要原因之一(Scott, 1999; Liu *et al.*, 2006; 邱星辉, 2014)。在昆虫的不同发育阶段及不同部位,其 P450 的活性存在一定差异,如棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫 P450 活性高于成虫,中肠 P450 活性高于脂肪体(邱立红等, 1999; 邱星辉等, 2002)。Wang 等 (2014) 研究表明 P450s 参与了二化螟对外源物质的代谢。

增效醚(piperonyl butoxide, PBO)因其具有抑制昆虫 P450 活性的特点,长期以来被用作研究昆虫抗药性机理的理想工具(Brattsten and Metcalf, 1970; Young *et al.*, 2005, 2006),并作为农药增效剂用于田间害虫防治。Qu 等(2003)通过增效醚试验,发现二化螟对杀虫单和三唑磷的抗药性与其 P450 活性上升密切相关。He 等(2014)通过活体增效实验发现田间二化螟种群对氯虫苯甲酰胺的抗性与多功氧化酶密切相关。羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)也是昆虫代谢杀虫药剂的重要酶系之一,尤其在拟除虫菊酯和有机磷类等杀虫药剂的代谢中发挥了重要作用。近年来国内外均有研究发现 PBO 对昆虫酯酶也具有一定的抑制作用(吴益东等, 2000; Young *et al.*, 2005, 2006)。

目前关于二化螟 P450 酶活性的系统研究还鲜见报道,PBO 处理对昆虫的解毒代谢酶活性影响的时间动态研究也较少。本研究对二化螟不同龄期幼虫及蛹的 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(7-ethoxycoumarin O-deethylase, ECOD)活性进行了测定及比较,并研究了 PBO 处理对二化螟幼虫体内 ECOD 和 CarE 活性的影响,这对于掌握二化螟 P450 等解毒酶系的特性及 PBO 对其的影响具有一定的意义,研究可以为二化螟的有效防治以及二化螟抗药性机理研究,提供基础的研究数据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

试虫卵块于 2010 年 6 月采自上海市浦东区水稻田,孵化后,在室内用新鲜茭白饲养多代后供试。饲养条件为:恒温养虫室,温度 28 ± 1℃,相对湿度 75% ~90%,光周期为 16L∶8D。

1.2 供试药剂及仪器

1.2.1 主要试剂:98% PBO 为美国 Chem Service 公司产品;苯甲基磺酰氟(PMSF, 99.0% 纯度),NADPH (98% 纯度)、α-乙酸萘酯(α-naphthyl acetate, α-NA)、毒扁豆碱(eserine)、固蓝 B 盐(fast blue B salt)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)均为 Sigma-Aldrich 公司产品;Tris base、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)(99%纯度)为美国 Promega 公司产品;7-乙氧基香豆素(7-ethoxycoumarin)、7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin)购自 Alfa Aesar 公司;考马斯亮蓝 G-250 为 Fluka 公司进口,上海化学试剂公司分装;乙二胺四乙酸(ethylene diamine

tetraacetic acid, EDTA)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、甘氨酸(Gly)、三氯乙酸(TCA)、甘油、85%磷酸、丙酮、KH_2PO_4 及 Na_2HPO_4 等均为北京化学试剂公司产品。

1.2.2　主要仪器：Eppendorf Centrifuge 5417C/R 型台式高速(冷冻)离心机；岛津 UV2550 型紫外分光光度计(Shimadu 公司)，LS-55 荧光分光光度计(Perkin Elmer 公司)；SPH-100B 型摇床(上海世平实验设备有限公司)；水浴锅为上海科技器材有限公司产品。

1.3　试虫处理

1.3.1　不同龄期试虫收集：参考陈长琨等(2000)方法将二化螟幼虫分为 1－6 龄及老熟幼虫。将各个龄期二化螟幼虫和蛹随机取 10 头测量体长、体重，设 3 组重复。同时选取 10～20 头不等数量的发育一致的各龄期二化螟幼虫和蛹，饥饿处理 3 h 后，用蒸馏水漂洗虫体，液氮冷却后置于－80℃冰箱中，用于测定 ECOD 活性。每个龄期的二化螟幼虫及蛹均设 3 个重复。

1.3.2　PBO 处理：挑取发育一致的二化螟 4 龄幼虫放于培养皿中，用微量点滴器(0.23 μL/滴)，剂量的确定参考 Young 等(2005)和彭宇等(2001)，将 88.63 mmol/L 的 PBO 丙酮溶液点滴于幼虫胸部背板，以丙酮作为对照。处理完，放入足够的饲料，置于温室中培养。点滴后 24 h 内，每隔 1 h 收集试虫，用蒸馏水清洗并除去体表水分，液氮冷却后放入－80℃冰箱备用。每个处理均设 3 组重复，每个重复收集 10 头试虫。

1.4　粗酶液制备

取二化螟幼虫放入冰浴冷却的玻璃匀浆器中，按 50 mg 虫重/mL 缓冲液的比例加入预冷的 0.1 mol/L 的 pH 7.5 磷酸缓冲液(含 15% 甘油，1.0 mmol/L EDTA，0.1 mmol/L DTT，1.0 mmol/L PMSF)，冰浴条件下充分匀浆。将匀浆液于 4℃ 10 800 r/min 下离心 15 min，收集上清液用脱脂棉过滤后得到酶液，用于 ECOD 活性的测定。为了进行 CarE 活性的测定，在粗酶液的制备中，使用 pH 7.0 的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液进行匀浆，其余操作与 ECOD 活性测定用的酶液制备过程相同。

1.5　酶活性测定

1.5.1　ECOD 活性测定：参考 Lee 和 Scott(1989)的方法并加以改进。总反应体系为 935 μL：0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 650 μL，25 μL 10 mmol/L 的 7-乙氧基香豆素和 10 μL 12 mmol/L NADPH，在反应体系中加入 250 μL 酶制备液启动反应，35℃ 225 r/min 的摇床中反应 10 min 后迅速取出并置于冰上，加入 300 μL 15% 的 TCA 终止反应。在对照管中补加酶液。反应完毕后，将反应混合液于 4℃ 10 800 r/min 下离心 1 min，取上清并加入 450 μL 1.6 mol/L pH 10.5 的 Gly-NaOH 溶液，震荡混匀后，在激发波长为 380 nm、发射波长为 450 nm 下测定产物的荧光值。每个处理重复 3 次，每个重复进行 3 次测定。将所测定的荧光值，使用 7-羟基香豆素标准曲线换算为酶反应生成的 7-羟基香豆素的量。再结合所使用的酶蛋白含量和酶反应时间，计算出 ECOD 活性，单位为 pmol/mg pro · min。

1.5.2　CarE 活性测定：参照 Zhang 等(2007)的方法，在试管中依次加入 1.8 mL 含有 3×10^{-4} mol/L α-乙酸萘酯和毒扁豆碱的磷酸缓冲液(0.04 mol/L, pH 7.0)和 0.5 mL 酶液。30℃下反应 15 min 后，加入固蓝 B 缓冲液(1% 固蓝 B 盐∶5% SDS，2∶5，v/v)终止反应并显色，对照补加酶液，静置 5 min 后，在 600 nm 下测定吸光值。每个处理重复 3 次，每个重复进行 3 次测定。将所测定的吸光值，用 α-萘酚的标准曲线换算为酶代谢反应生成的 α-萘酚的量。再结合所使用的酶蛋白含量和酶反应时间，计算出 CarE 的比活力，单位为 mmol/mg pro · min。

1.6　7-羟基香豆素标准曲线的测定

将 7-羟基香豆素配成 1×10^{-1}mol/L 的贮备液，然后用 1.6 mol/L pH 10.5 的 Gly-NaOH 液将贮备液稀释成 6～7 个浓度梯度，以 Gly-NaOH 作为对照，在激发波长为 380 nm，发射波长为 450 nm 下测定产物的荧光值。每个浓度设 3 个重复，每个重复测定 3 次。以荧光值的平均值为横坐标，以 7-羟基香豆素的浓度(nmol/L)为纵坐标，制作 7-羟基香豆素标准曲线。

1.7　蛋白含量测定

参照 Bradford (1976)考马斯亮蓝 G-250 方法测定蛋白含量。采用 3 mL 的反应体系：0.5 mL 酶制备液及 2.5 mL 考马斯亮兰 G-250。室温反应 5 min 后，测定 595 nm 下的吸光值。以牛血清白蛋白作标准曲线，计算酶制备液中蛋白质含量。

1.8　数据统计

将实验所得的数据，用 SPSS11.5 软件进行统计分析。对不同龄期二化螟幼虫和蛹的 ECOD 活性的差异显著性，采用 ANOVA 的 LSD 方法进行分析；对 PBO 处理前后二化螟的 ECOD 和 CarE 活性的差异显著性，采用 t-检验进行分析；以 $P<0.05$ 作为差异显著性标准。

2 结果

2.1 不同龄期二化螟幼虫和蛹的体长、体重及 ECOD 活性

不同龄期二化螟幼虫和蛹的体长、体重及 ECOD 活性的测定结果见表 1。从二化螟各发育阶段的体长和体重可以看出,二化螟在 4 龄幼虫期后生长发育逐渐加快,并在老熟幼虫期达到最大值(表 1)。从表 1 的结果还可以看出,二化螟的 ECOD 活性呈现出随着二化螟的生长发育而先升高后降低的变化趋势。EOCD 活性从 1 龄幼虫期开始,经 2 龄和 3 龄幼虫期而逐渐升高,在 4 龄幼虫期达到最高值 14.11 pmol/mg pro · min,在 5 和 6 龄幼虫期继续保持了较高的 ECOD 活性后,开始逐渐降低,ECOD 在老熟幼虫期降至与1 龄幼虫期相同水平,并在蛹期降到最低值 1.34 pmol/mg pro · min。

表 1 不同龄期二化螟幼虫和蛹的体长、体重及 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶活性

Table 1 The body length and body weight, and the specific activity of ECOD in different instar larvae and pupae of *Chilo supperssalis*

发育阶段 Developmental stage	体长(mm) Body length	体重(mg) Body weight	7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶活性(pmol/mg pro · min) Specific activity of ECOD
1 龄幼虫 1st instar larva	1.13 ± 0.18	2.27 ± 0.03	6.29 ± 0.88 cd
2 龄幼虫 2nd instar larva	1.37 ± 0.07	6.43 ± 0.09	9.58 ± 0.95 bc
3 龄幼虫 3rd instar larva	10.70 ± 0.10	9.43 ± 0.07	10.94 ± 0.59 b
4 龄幼虫 4th instar larva	14.05 ± 1.53	20.63 ± 0.43	14.11 ± 1.01 a
5 龄幼虫 5th instar larva	16.67 ± 2.20	42.33 ± 3.18	12.58 ± 1.43 ab
6 龄幼虫 6th instar larva	19.72 ± 0.79	71.03 ± 0.92	12.54 ± 0.41 ab
老熟幼虫 Mature larva	22.17 ± 4.64	94.10 ± 3.23	6.89 ± 0.35 c
蛹 Pupa	11.50 ± 2.32	44.60 ± 2.93	1.34 ± 0.11 e

表中数据为平均值 ± 标准差;同列中不同小写字母表示不同发育阶段二化螟间 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶活性差异显著($P < 0.05$, LSD 法)。Data are means ± *SD*. Different lowercase letters following the data in the same column represent significant difference among the specific activities of ECOD in *C. supperssalis* at different developmental stages ($P < 0.05$, LSD method).

2.2 PBO 处理后 24 h 内二化螟 4 龄幼虫 ECOD 活性

从图 1 可以看出,与未处理对照相比,PBO 处理对二化螟 ECOD 活性产生了一定影响,并且这种影响还具有时间效应。随着处理后时间的延长,PBO 对二化螟 ECOD 活性产生了先抑制-再诱导-又抑制的动态影响作用。在处理后 4 – 9 h,二化螟 ECOD 活

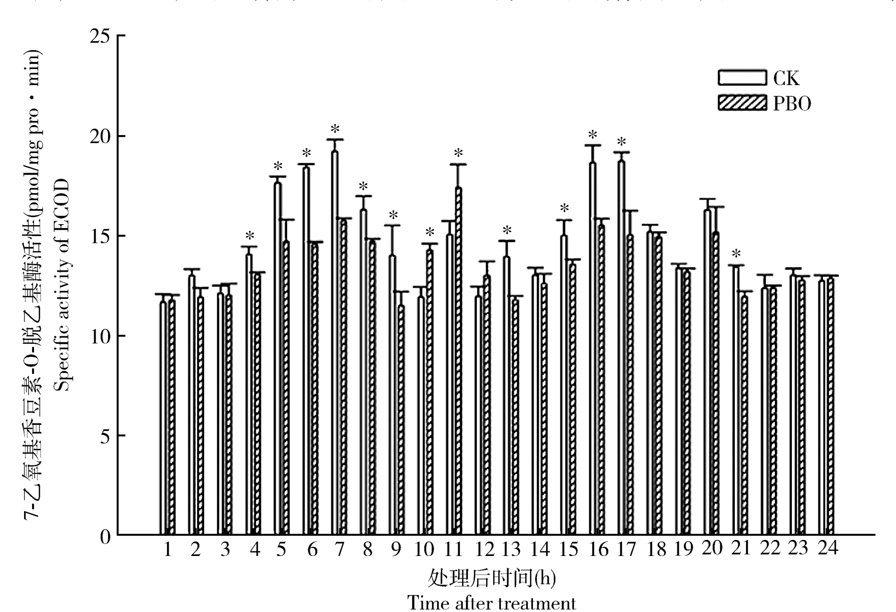


图 1 PBO 处理后 24 h 内二化螟 4 龄幼虫 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶活性

Fig. 1 The specific activity of ECOD in the 4th instar larvae of *Chilo supperssalis* within 24 h after PBO treatment

图中数据为平均值 ± 标准差;柱上星号表示处理组与未处理组 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶活性具有显著差异(t 检测, $P < 0.05$)。Data are means ± *SD*. The asterisk above the bar indicates significant difference in the specific activity of ECOD between the treatment group and the untreated control (CK) (t-test, $P < 0.05$).

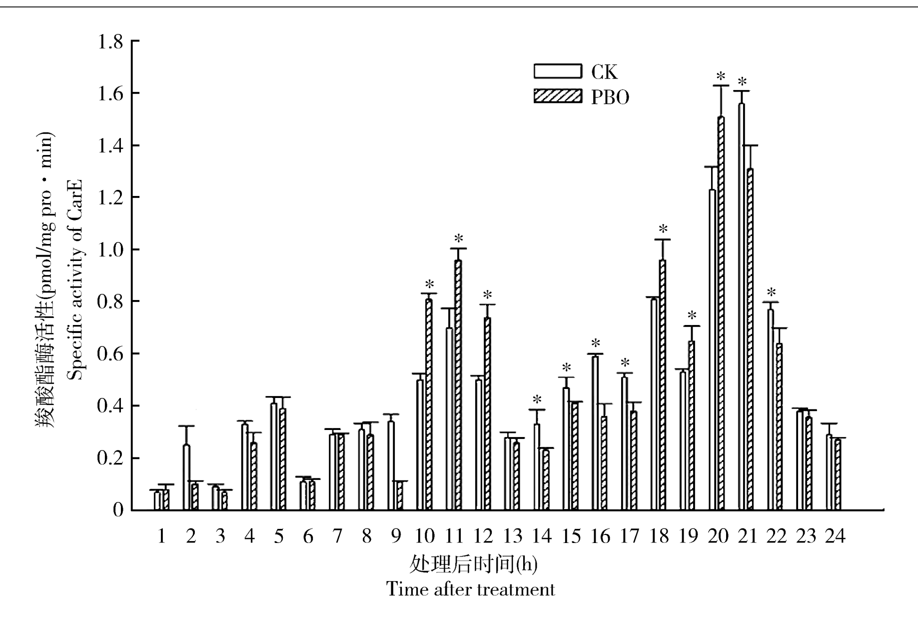


图 2　PBO 处理后 24 h 内二化螟 4 龄幼虫的羧酸酯酶活性

Fig. 2 The specific activity of CarE in the 4th instar larvae of *Chilo supperssalis* within 24 h after PBO treatment

图中数据为平均值 ± 标准差；柱上星号表示处理组与未处理组羧酸酯酶活性具有显著差异（*t*-检测，$P < 0.05$）。Data are means ± *SD*. The asterisk above the bar indicates significant difference in the specific activity of CarE between the treatment group and the untreated control (CK) (*t*-test, $P < 0.05$).

性受到了 PBO 的抑制，其中在 6 h 的抑制率达到 21%；在处理后 10 – 11 h，处理组 ECOD 活性高于对照组，PBO 诱导了二化螟的 P450 活性；处理后 15 – 17 h，PBO 又对 ECOD 活性产生了抑制作用。

从图 2 可以看出，PBO 处理也对二化螟 CarE 活性产生了影响，与 PBO 对二化螟 ECOD 活性的影响相比，PBO 对 CarE 活性的影响出现的较为滞后。在处理后 10 – 22 h，PBO 对二化螟的 CarE 活性产生了诱导-抑制-诱导的动态影响作用，其中在处理后 10 – 12 h 和 18 – 20 h 时间段表现为诱导作用，在 14 – 17 h和 21 – 22 h 时间段产生了一定的抑制作用。

3　讨论

昆虫耐药性与其生长发育阶段密切相关。同一昆虫处于不同龄期对杀虫药剂的敏感性存在差异，这与不同龄期昆虫中靶标酶和解毒酶的活性不同有关，而且，昆虫抗药性的形成和发展也与不同龄期昆虫的靶标酶和解毒酶的活性变化密切相关。Campanhola 和 Plapp (1989) 通过对烟芽夜蛾抗氯氰菊酯品系的研究发现，在这一品系中同时存在靶标抗药性和代谢抗药性，其中在 1 龄幼虫和成虫中，靶标抗性更为重要，而在 3 龄幼虫中，代谢抗性发挥的作用更大。吴青君等(2002)研究发现，谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)在小菜蛾低龄幼虫的抗性中发挥了主要作用，随着龄期增加，CarE 则发挥了主导作用。可见，昆虫耐药性及抗药性发展与其生长发育阶段密切相关。细胞色素 P450 酶系是昆虫体内重要的解毒酶系，在昆虫抗药性形成中发挥了重要作用，因此本研究对二化螟 1 龄幼虫至蛹等各发育期的 ECOD 活性进行了测定及比较。结果显示，二化螟 ECOD 活性在幼虫期高于蛹期，其中在 4 – 6 龄幼虫期最高。此结果与邱星辉等 (2002) 对棉铃虫中 P450 活性的研究结果类似。在棉铃虫不同发育期中 P450 活性依次为幼虫中肠 > 幼虫脂肪体 > 蛹 > 成虫。然而有研究测定了烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的 P450 活性，发现在同一种群中，P450 活性在成虫中大于幼虫，在不同种群间，成虫 P450 酶系活性相似，而在幼虫期则差异较大 (Kirby *et al*., 1994)。可见，昆虫 P450 活性不仅与昆虫的发育期密切相关，也与昆虫的种类和种群具有一定的关系。

PBO 作为 P450 酶的抑制剂，已被广泛用作有效的杀虫剂增效剂，但关于 PBO 对昆虫解毒酶影响的时间效应研究还相对较少。本研究中考察了 PBO 处理二化螟 4 龄幼虫后 24 h 内，对二化螟 4 龄幼虫 ECOD 活性影响的时间效应。发现，在处理后的 24 h 内，PBO 对二化螟 ECOD 活性的影响表现了抑制-诱导-抑制的时间效应。在处理后 4 – 9 h，PBO 对二化螟 ECOD 活性产生了抑制，其中在处理后第 6 h 时，PBO 对 ECOD 活性的抑制率达到 21%。在处理后 10 – 11 h，PBO 诱导了二化螟的 ECOD 活性，而在处理后 15 – 17 h，PBO 又对 ECOD 活性产生了

抑制作用。此结果与 Kinsler 等(1990)的研究结果类似。Kinsler 等(1990)研究发现 PBO 对小鼠 P450 表现出了双向影响的作用,PBO 处理小鼠后,在最初的 2 h 内,对肝微粒体部位的 P450 活性表现出了抑制作用,随后又由于某些 P450 同工酶被诱导而导致了 P450 活性的增加。

PBO 对二化螟 ECOD 活性影响的时间效应,不仅与 PBO 对昆虫中多种不同 P450 同工酶具有不同的影响有关,还应与昆虫对 PBO 具有一定的代谢能力有关。昆虫对 PBO 的代谢会导致昆虫中 PBO 浓度随着代谢时间而变化,从而导致昆虫中 PBO 对 P450 酶的影响具有随着时间而变化的时间效应。掌握 PBO 在昆虫中的代谢规律与其对昆虫 P450s 酶活性影响的关系,对于明确 PBO 的增效机制以及合理使用 PBO,均十分重要,这还有待于进一步研究。

PBO 处理不仅会对昆虫的细胞色素 P450 酶系产生影响,还会对昆虫中其他解毒酶系产生一定的影响。许雄山等(1999)研究发现,PBO 处理棉铃虫 3 龄幼虫 1 h 后不仅抑制了其多功能氧化酶的活性,还对 AChE 和 CarE 活性也产生了一定的抑制作用,而对 GSTs 活性无抑制。Young 等(2005, 2006)报道,PBO 对棉铃虫和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 体内与菊酯抗性相关的酯酶活性具有一定的抑制作用,其中,在处理后 10 h 达到最大抑制率,而且 PBO 在体外对酯酶活性的抑制率随 PBO 浓度升高而升高;同时,田间试验表明在喷洒杀虫剂 5 h 前使用 PBO 可达到最大的增效效果。Willoughby 等(2007)报道 PBO 处理黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 4 h 后诱导了 12 个 P450 基因和 5 个 GSTs 基因的表达,而酯酶基因的变化不大。本文研究了 PBO 处理后 24 h 内二化螟 CarE 的活性变化,发现:与 PBO 对二化螟 ECOD 活性的影响相比,PBO 对二化螟 CarE 活性的影响相对滞后。在处理后 10 – 22 h, PBO 对二化螟的 CarE 活性主要表现出诱导-抑制-诱导的影响。其中,在 PBO 处理后 10 – 12 h 和 18 – 20 h 时间段表现为诱导作用,而在 14 – 17 h 和 20 – 21 h 时间段产生了一定的抑制作用。

可见,PBO 处理对二化螟幼虫的 ECOD 和 CarE 的活性均产生了一定的影响,但具有不同的时间效应,这应与 PBO 主要是 P450 酶的抑制剂,因而 PBO 对 P450 酶活性与 CarE 活性会产生不同的影响有关,还应与 P450 酶和 CarE 是昆虫中两种不同功能的解毒酶有关。因此,在 PBO 处理产生的胁迫下,二化螟 ECOD 和 CarE 产生的变化有所不同。

综上,PBO 处理对二化螟的 ECOD 和 CarE 活性均产生了一定的影响,并且这种影响还具有一定的时间效应。其中 PBO 对 ECOD 活性的影响较大,主要是抑制作用,PBO 处理对二化螟中 CarE 活性的影响较小,并且出现较迟,因此,PBO 对杀虫剂的昆虫毒性的增效机制除了与其对昆虫 P450 酶的影响有关,也与其对 CarE 等酶系的影响有关。本研究仅从时间效应方面考察了 PBO 处理后 24 h 内对二化螟主要解毒酶活性的影响,有关 PBO 对二化螟细胞色素 P450 和 CarE 活性影响的剂量效应以及昆虫对 PBO 的代谢规律及其与 PBO 增效作用的关系等,还有待进一步深入研究。

参考文献(References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254.

Brattsten LB, Metcalf RL, 1970. The synergistic ratio of carbaryl with piperonyl butoxide as an indicator for the distribution of multifunction oxidases in the Insecta. *J. Econ. Entomol.*, 63(1): 101 – 104.

Campanhola C, Plapp FWJr, 1989. Pyrethroid resistance in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae): insecticide bioassays and field monitoring. *J. Econ. Entomol.*, 82(1): 22 – 28.

Chang JH, He YP, 2016. Review on the insecticide resistance of *Chilo suppressalis*. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 13(9): 4 – 6. [常菊花, 何月平, 2016. 二化螟对常用杀虫剂的抗性研究进展. 长江大学学报(自然科学版), 13(9): 4 – 6]

Chen CK, Li XF, Han ZJ, Li GQ, Wang YC, 2000. Method for monitoring insecticide resistance in rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker) and relative susceptible baselines data. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 23(4): 25 – 28. [陈长琨, 李秀峰, 韩召军, 李国清, 王荫长, 2000. 二化螟抗药性监测方法及相对敏感基线. 南京农业大学学报, 23(4): 25 – 28]

Chi SY, Peng Y, Wang YC, Han ZJ, Chen CK, 2005. Advances in the research of insecticide resistance of *Chilo suppressalis*. *Plant Protection*, 31(6): 3 – 6. [池仕运, 彭宇, 王荫长, 韩召军, 陈长琨, 2005. 二化螟对杀虫剂抗药性的研究进展. 植物保护, 31(6): 3 – 6]

He YP, Gao CF, Chen WM, Huang LQ, Zhou WJ, Liu XG, Shen JL, Zhu YC, 2008. Comparison of dose responses and resistance ratios in four populations of the rice stem bore, *Chilo supperssalis* (Lepidoptera: Pyralidae), to 20 insecticides. *Pest Manag. Sci.*, 64: 308 – 315.

He YP, Zhang JF, Chen JM, 2014. Effect of synergists on susceptibility to chlorantraniliprole in field population of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 107: 791 – 796.

Kinsler S, Levi PE, Hodgson E, 1990. Relative contributions of the cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenases to the microsomal oxidation of phorate following treatment of mice with phenobarbital, hydrocortisone, acetone, and piperonyl butoxide. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37(2): 174–181.

Kirby ML, Young RJ, Ottea JA, 1994. Mixed-function oxidase and glutathione S-transferase activities from field-collected larval and adult tobacco budworms, *Heliothis virescens* (F.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 49(1): 24–36.

Lee SS, Scott JG, 1989. An improved method for preparation, stabilization, and storage of housefly (Diptera: Muscidae) microsomes. *J. Econ. Entomol.*, 82(6): 1559–1563.

Liu NN, Zhu F, Xu Q, Pridgeon JW, Gao XW, 2006. Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: mechanisms of insecticide resistance. *Acta Entomol. Sin.*, 49(4): 671–679.

Lu YH, Zhao YY, Zhang FC, Zheng XS, Zhu PY, Lv ZX, 2016. Cloning and spatiotemporal and temperature-induced expression profiling of diapause bioclock protein TIME-EA4 gene in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(4): 392–401.［鲁艳辉，赵燕燕，张发成，郑许松，朱平阳，吕仲贤，2016. 二化螟滞育生物钟蛋白 TIME-EA4 基因的克隆及时空和温度诱导表达分析. 昆虫学报，59(4): 392–401］

Peng Y, Chen CK, Han ZJ, Wang YC, Li GQ, 2001. Studies on resistant measurement to 3 insecticides and the synergisms of synergists and insecticide-mixtures in *Chilo suppressalis*. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 23(3): 265–268.［彭宇，陈长琨，韩召军，王荫长，李国清，2001. 二化螟对 3 种杀虫剂的抗性测定及增效作用研究. 湖北大学学报(自然科学版)，23(3): 265–268］

Qiu LH, Zhang WJ, Li XW, 1999. Changes of component contents and enzyme activities of microsomal mixed-function oxidases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) during different stages. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 1(1): 45–50.［邱立红，张文吉，李晓薇，1999. 棉铃虫微粒体多功能氧化酶系组分含量及酶活性在不同生长发育阶段的变化规律研究. 农药学学报，1(1): 45–50］

Qiu XH, 2014. Molecular mechanisms of insecticide resistance mediated by cytochrome P450s in insects. *Acta Entomol. Sin.*, 57(4): 477–482.［邱星辉，2014. 细胞色素 P450 介导的昆虫抗药性的分子机制. 昆虫学报，57(4): 477– 482］

Qiu XH, Li W, Leng XF, 2002. Comparison of microsomal P450 monooxygenases in midgut and fatbody tissue of 6th instar larvae of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Acta Zoologica Sinica*, 48(2): 208–212.［邱星辉，李薇，冷欣夫，2002. 棉铃虫 6 龄幼虫中肠与脂肪体 P450 酶系的比较. 动物学报，48(2): 208–212］

Qu MJ, Han ZJ, Xu XJ, Yue LN, 2003. Triazophos resistance mechanism in rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 77: 99–105.

Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29: 757–777.

Wang BJ, Shahzad MF, Zhang Z, Sun HN, Han P, Li F, Han ZJ, 2014. Genome-wide analysis reveals the expansion of cytochrome P450 genes associated with xenobiotic metabolism in rice striped stem borer, *Chilo suppressalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443: 756–760.

Willoughby L, Batterham P, Daborn PJ, 2007. Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. *Pest Manag. Sci.*, 63(8): 803–808.

Wu QJ, Zhang WJ, Zhang YJ, Xu BY, Zhu GR, 2002. Cuticular penetration and desensitivity of GABAA receptor in abamectin resistant *Plutella xylostella* L. *Acta Entomol. Sin.*, 45(3): 336–340.［吴青君，张文吉，张友军，徐宝云，朱国仁，2002. 表皮穿透及 GABAA 受体不敏感性在小菜蛾及阿维菌素抗性中的作用. 昆虫学报，45(3): 336–340］

Wu YD, Yang YH, Chen J, Li AM, Shen JL, Shen WB, 2000. Inhibition of cytochrome P450 in *Helicoverpa armigera* (Hübner) by piperonyl butoxide (PBO) and its synergism to pyrethroids. *Acta Entomol. Sin.*, 43(2): 138–142.［吴益东，杨亦桦，陈进，李爱玫，沈晋良，沈文飚，2000. 增效醚(PBO)对棉铃虫细胞色素 P450 的抑制作用及对拟除虫菊酯的增效作用. 昆虫学报，43(2): 138–142］

Xin W, Zhang ZT, 2001. Research advance on *Chilo suppressalis* population dynamics and management. *Entomological Knowledge*, 38(4): 1–6.［辛文，张志涛，2001. 二化螟种群动态及管理研究进展. 昆虫知识，38(4): 1–6］

Xu XS, Han ZJ, Wang YC, 1999. Study on the toxicology of PBO on third instar cotton bud worm (*Helicoverpa armigera*) larva. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 1(2): 42–46.［许雄山，韩召军，王荫长，1999. 增效醚对棉铃虫的毒理学研究. 农药学学报，1(2): 42–46］

Young SJ, Gunning RV, Moores GD, 2005. The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.*, 61: 397–401.

Young SJ, Gunning RV, Moores GD, 2006. Effect of pretreatment with piperonyl butoxide on pyrethroid efficacy against insecticide-resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Bemisia tabaci* (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.*, 62: 114–119.

Zhang L, Gao XW, Liang P, 2007. Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89: 65–72.

（责任编辑：袁德成）